

APPLICATIONS DES TECHNIQUES SPECTROMETRIQUES DANS LE DOMAINE
DES PRODUITS NATURELS EXTRAITS DES LOGANIACEAE

par

Luc ANGENOT et Claude COUNE

(Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Liège)

Résumé de la communication présentée le 19 octobre 1981, lors d'une réunion du groupe de contact: "Onderzoek van biologisch actieve natuurstoffen/Recherche de nouveaux agents biologiquement actifs à partir de sources naturelles" du NFWO/FNRS.

Nos recherches sont consacrées depuis plusieurs années à l'étude des Loganiacées africaines, plantes toxiques et médicinales des genres *Strychnos* et *Anthocleista* qui renferment de nombreuses molécules nouvelles.

Autrefois, la méthode classique de détermination de structure requérait la dégradation des molécules isolées au préalable en grande quantité et sans l'apport décisif des méthodes chromatographiques qui ne se sont développées que ces 20 dernières années.

C'est ainsi qu'il a fallu des kgs de strychnine et quasi 150 ans pour établir la structure de cet alcaloïde extrait des noix vomiques.

Actuellement, les techniques spectrométriques permettent d'élucider assez rapidement la structure de la plupart des molécules et ce, même à partir de quantités minimales de produits purs.

La première étape dans l'élucidation de structure est de préciser quelle est la nature et si possible, le squelette des molécules, et ceci peut souvent être facilité par un dépouillement de la littérature phytochimique.

Au préalable, des connaissances en chimiotaxinomie sont très utiles pour établir la nature des molécules isolées; ensuite une connaissance de la biosynthèse des métabolites secondaires que sont les principes actifs des plantes, permet de prévoir les modes de substitution les plus logiques, une fois que le noyau structural de base a été bien établi. Dans le cas des principes des Loganiacées, il convient de consulter notamment les références bibliographiques de portée générale ^{1,6,7}.

Ces recherches bibliographiques vont ensuite faciliter l'interprétation des différents spectres (UV, IR, RMN, Masse) des produits isolés en les comparant à ceux de molécules connues et à ceux de molécules voisines formées par des réactions d'acétylation, méthylation ou réduction.

Il faut insister sur le fait que presque toujours, la structure d'une molécule résulte d'une convergence de renseignements obtenus à partir des spectres fournis par les différentes techniques spectrométriques que nous allons rapidement énumérer ci-dessous. Notre propre expérience a été relatée dans diverses publications ^{6 à 21}.

1. Spectroscopie dans l'ultra-violet et le visible

- identification des chromophores et non de la molécule entière
- détection et position des substituants éventuels

La spectroscopie UV et visible est particulièrement intéressante dans le domaine des alcaloïdes contenant le noyau indole ^{1,3,4}

2. Spectroscopie dans l'infra-rouge

- empreinte digitale, utile pour l'identification à des molécules connues répertoriées dans des atlas ^{1,3}, sauf si la résolution du spectre est insuffisante. (Il est toujours conseillé de confirmer l'identité par C.C.M. dans différents systèmes).
- détermination de groupements fonctionnels particuliers (carbonyl...)
- mode de substitution des noyaux aromatiques
- parfois éléments de stéréochimie

3. Spectrométrie de masse

- détermination du poids moléculaire (difficile pour les substances non volatiles comme les bases quaternaires)

- détermination de la formule brute, par mesure à haute résolution de la masse précise de l'ion moléculaire
- éléments ou totalité de la structure plane, suite à une analyse des fragments et par comparaison avec ceux des produits homologues, en tenant compte de la nature et de la position des substituants, d'un niveau différent d'oxydation du chromophore indolique et des chaînes latérales (éthyle, éthylidène, vinyle...) ^{2,4,5}.

4. Spectroscopie RMN¹H

- estimation qualitative et quantitative des protons, d'autant plus complète que l'on dispose des champs élevés qui augmentent la résolution du spectre et permettent la prise de spectre de produits isolés en faible quantité.
- étude de la stéréochimie des molécules (rotamères, conformères, isomères) en collaboration avec des spectroscopistes et en montant les modèles Dreiding ⁸.

5. Spectroscopie RMN¹³C

La RMN du carbone 13 a pour particularité de montrer non seulement les résonances des carbones mais aussi leurs relations avec les protons de la molécule étudiée via les constantes de couplages hétéronucléaires. Ces couplages peuvent être supprimés à volonté et les spectres obtenus deviennent alors beaucoup plus simples à lire que les spectres protons. Au premier abord, les spectres de RMN¹³C fournissent:

1) des éléments de structures:

- A. nombre de carbones (spectres en découplage total quantitatifs, c'est-à-dire avec relaxation complète et suppression de l'effet nucléaire d'Overhauser)
- B. nombre de protons en utilisant la multiplicité des carbones dans les spectres en découplage off-résonance ou de simple résonance
- C. présence dans la molécule de carbones particuliers: carbonyles, carbones "spiro"
- D. présence de substituants: les substituants modifient les déplacements chimiques des carbones substitués et de leurs voisins

d'une manière connue et reproductible. On peut donc déterminer leur position et leur nature si l'on connaît les déplacements chimiques de la molécule non substituée ou d'un homologue ^{24,25}.

L'ensemble de ces renseignements permet souvent de confirmer ou d'infirmer des données obtenues par d'autres méthodes.

2) des éléments de stéréochimie.

Comme les carbones constituent le squelette des molécules organiques, ils reflètent de manière sensible la stéréochimie de cette molécule.

On peut ainsi distinguer, sur base des déplacements chimiques

- des épimères (par exemple les isomères de type strychnofoline)
- des conformères au niveau de l'azote dans les quinolizidines ²²
- des conformations de cycles, par exemple la diplocéline ²³.

3) les résonances du spectre proton:

Les couplages hétéronucléaires carbone ¹³C-proton permettent de déterminer les résonances protons de la molécule étudiée en observant son spectre ¹³C soit par découplage hétéronucléaire direct ou par calcul. La détermination des résonances protons par calcul peut se faire de différentes façons et se révèle particulièrement utile pour les molécules dont le spectre proton est fort dense ²⁶.

6. Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est une méthode permettant de résoudre des problèmes de stéréochimie pour autant que les centres asymétriques de la molécule étudiée soient situés à proximité d'un chromophore mesurable. En pratique, les résultats ne peuvent être interprétés de manière absolue et doivent être situés dans une série homologue de stéréochimie connue.

7. Diffraction aux rayons X

La diffraction des rayons X est la méthode de détermination de structure à la fois la plus séduisante et la plus exigeante: séduisante parce qu'elle fournit directement la structure complète de la molécule étudiée y compris sa configuration (relative ou absolue selon les cas);

exigeante parce qu'elle requiert de nombreux et coûteux calculs sur ordinateur et surtout qu'elle ne s'applique qu'à des cristaux de taille et de forme convenables.^{7,15}

BIBLIOGRAPHIE

1. HESSE, M. Indolalkaloide in Tabellen, Springer Verlag - Berlin - vol. I (1964); vol. II (1968).
2. BUDZIKIEWICZ, H., DJERASSI, C. et WILLIAMS, D.H. Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry - vol. I Alkaloids (1964).
3. NEUSS, N. Physical Data of Indole and Dihydroindole Alkaloids. Lilly Research Laboratories - Indianapolis U.S.A. (1964 et suppl.).
4. GABETTA, B. - MUSTICH, G. a) Spectral Data of Indole Alkaloids, Inverni della Beffa, Milan (1975)
b) *Fitoterapia*, 47, 247 (1976).
5. HESSE, M. Indolalkaloide -Progress in Mass Spectrometry, Verlag Chemie, Weinheim (1974).
6. LEEUWENBERG, A.J.M. Die Natürlichen Pflanzenfamilien, Band 28 b I, Duncker & Humblot, Berlin (1980) (nombreuses références citées).
7. PHILLIPSON J.D. and ZENK, M. Indole and Biogenetically Related Alkaloids - Academic Press, London (1980) (nombreuses références citées)
8. TAVERNIER, D., ANTEUNIS, M., TITS, M. et ANGENOT, L. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 87, 595 (1978).
9. TITS, M., TAVERNIER, D. et ANGENOT, L. *Phytochemistry*, 18, 515 (1979).
10. KAMBU, K., COUNE, C. et ANGENOT, L. *Planta Med.*, 37, 161 (1979).
11. LAMBOTTE, J., DUPONT, L., DIDEBERG, O., KAMBU, K. et ANGENOT, L. *Tetrahedron Lett.*, 20, 4227 (1979).
12. TITS, M., TAVERNIER, D. et ANGENOT, L. *Phytochemistry*, 19, 1531 (1980).
13. COUNE, C., ANGENOT, L. et DENOËL, J. *Phytochemistry*, 19, 2009 (1980).
14. COUNE, C. et ANGENOT, L. *Herba Hungarica*, 19, 189 (1980).
15. DUPONT, L., DIDEBERG, O., LAMOTTE, J., KAMBU, K. et ANGENOT, L. *Acta Cryst.*, B36, 1669 (1980).
16. TITS, M., ANGENOT, L. et TAVERNIER, D., *Tetrahedron Lett.*, 21, 2439 (1980).
17. TITS, M. et ANGENOT, L., *Plantes méd. et Phytothér.*, 14, 213 (1980).

18. ANGENOT, L. et TITS, M., *Planta Med.*, 41, 240 (1981).
19. CAPRASSE, M. et ANGENOT, L., *Planta Med.*, 42, 364 (1981).
20. TITS, M., FRANZ, M., TAVERNIER, D. et ANGENOT, L., *Planta Med.*, 42, 371 (1981).
21. CAPRASSE, M., COUNE, C. et ANGENOT, L., *J. Pharm. Belg.*, 36, 243 (1981).
22. WENKERT, E. et al., *Acc. Chem. Res.*, 7, 47 (1974).
23. COUNE, C. Thèse de Doctorat en Sciences Pharmaceutiques - Université de Liège (1980).
24. WEHRLI, F.W. and WIRTHLIN, T. Interpretation of Carbon-13 NMR Spectra. Heyden-London (1976).
25. SHAMMA, M. and HINDENLANG, D.M. Carbon-13 NMR Shift assignments of amines and alkaloids. Plenum Press-New York (1979).
26. STIBBS, P. *Analyst. Chem.*, 52, 569 (1980).